

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-243598

(43)Date of publication of application : 19.09.1997

(51)Int.Cl.

G01N 27/447  
G01N 21/64

(21)Application number : 08-080751

(71)Applicant : SHIMADZU CORP

(22)Date of filing : 08.03.1996

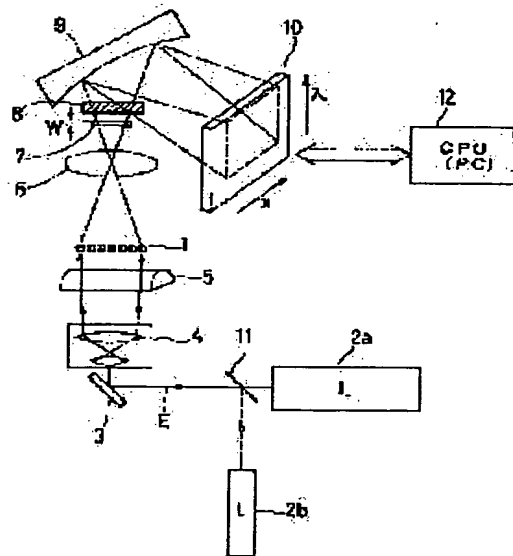
(72)Inventor : NAKAMURA SHIN

## (54) APPARATUS FOR DETERMINING ARRANGEMENT OF MULTI-CAPILLARY DNA BASE

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To enhance the processing capability furthermore in a multi-capillary DNA sequencer.

**SOLUTION:** The angles or excited optical beams E from optical exciting lasers 2a and 2b are changed at a planar mirror 3. The beam is expanded in a beam expander 4. The light is condensed in the line shape by a cylindrical lens 5. The light is applied on the capillary array of a migrating part 1. Then, the mark fluorescent material of the DNA fragment migrating in the capillary array is excited. The generated fluorescence is accepted as the image with a macro-lens 6 together with the excited light. The excited-light component is shielded by a notch filter 8 through a slit 7 and divided in a concave grating 9. The image of the spectroscoped fluorescent light at the capillary array is formed on a detector 10. In a CPU 12, the position data of the capillary array are obtained as the data on the detector 10 in the (x) direction, and the spectroscopic signal at each capillary position is obtained in the  $\lambda$  direction. The alignment of the base of the DNA sample at each capillary is obtained accompanied by the elapse of time.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 08.02.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 08.06.2004

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2004-14122

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 08.07.2004

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-243598

(43)公開日 平成9年(1997)9月19日

(51)IntCl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所	
G 0 1 N	27/447		G 0 1 N	27/26	3 2 5 E
	21/64			21/64	Z
				27/26	3 1 5 K
					3 2 5 B

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平8-80751

(22)出願日 平成8年(1996)3月8日

(71)出願人 000001993

株式会社島津製作所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

(72)発明者 中村 伸

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

株式会社島津製作所三条工場内

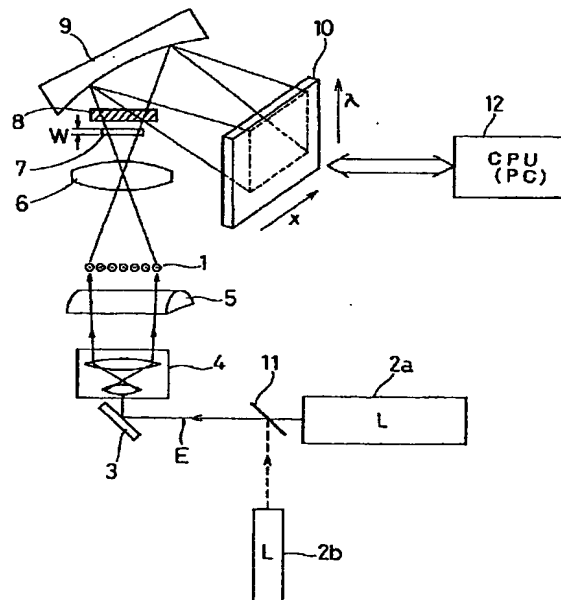
(74)代理人 弁理士 野口 繁雄

(54)【発明の名称】 マルチキャピラリーDNA塩基配列決定装置

(57)【要約】

【課題】 マルチキャピラリーDNAシーケンサで、さらに処理能力を高める。

【解決手段】 励起光用レーザ2a、2bから出た励起光ビームEは平面ミラー3で角度を変え、ビームエキスパンダー4でビームが広げられ、シリンドリカルレンズ5でライン状に集光されて泳動部1のキャピラリーアレイに照射される。キャピラリーアレイ中を泳動するDNAフラグメントの標識蛍光物質が励起され、発生した蛍光は励起光とともにマクロレンズ6でイメージとして取り込まれ、スリット7を経てノッチフィルタ8で励起光成分が遮光され、凹面グレーティング9で分光され、検出器10上にキャピラリーアレイの分光された蛍光像を結像させる。CPU12では、検出器10上のデータとしてx方向にキャピラリーアレイの位置データ、λ方向に各キャピラリー位置での分光信号を得、時間の経過に伴って各キャピラリーでのDNA試料の塩基配列を得る。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ゲルが充填された複数のキャピラリーが配列され、2種類以上の蛍光物質により識別可能に標識された4種類の末端塩基の異なるDNAフラグメントを含む複数の試料が1つずつ前記キャピラリーに注入されて、全てのキャピラリーで同時に電気泳動されるマルチキャピラリーアレイ泳動部と、

前記マルチキャピラリーアレイ泳動部のキャピラリーアレイの面に対する垂直方向から、泳動方向と直交する1直線に沿って、全キャピラリーに励起光ビームを照射する励起光学系と、

前記励起光学系の励起光ビームにより励起された全キャピラリーの試料からの蛍光を受光し、前記キャピラリーアレイのキャピラリーの配列方向と直交する方向に波長分散させる分光手段、及びその分光手段により分光された各キャピラリーの試料からの蛍光スペクトルを検出する2次元検出器を備えた受光光学系と、

前記受光光学系の2次元検出器の検出信号からキャピラリーの位置と検出したDNAフラグメントの末端塩基の種類とを認識することにより、各キャピラリーにおける試料の塩基配列を決定するデータ処理・制御部と、を備えたことを特徴とするマルチキャピラリーDNA塩基配列決定装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は蛍光プライマー（標識として蛍光物質を化学結合させたプライマー）を用いサンガーの方法で前処理されたDNAフラグメント（断片）試料を電気泳動させ、泳動途中でDNAフラグメントからの蛍光を検出して塩基配列を決定するオンライン式のDNAシーケンサに関するものである。特に、本発明は泳動ゲルを充填した複数のキャピラリーを用いて複数の試料を同時に電気泳動させるマルチキャピラリーDNAシーケンサに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 人ゲノムのような長大な塩基配列をもつDNAの塩基配列決定には、高感度で、高速で、かつ大処理能力をもったDNAシーケンサが必要となる。その1つの方法として、平板状のスラブゲルを用いたものに代わってゲルを充填したキャピラリーを複数本配列したマルチキャピラリーDNAシーケンサが提案されている。キャピラリーは、スラブゲルに比べて、試料の取扱いや注入が容易であるだけでなく、高速に泳動させて高感度で検出できる。つまり、スラブゲルで高電圧を印加すれば、ジュール熱の影響によりバンドが広がったり、温度勾配が生じるなどの問題が生じるが、キャピラリーではそのような問題は少なく、高電圧を印加して高速泳動をさせても、バンドが広がりが少なく高感度検出ができるのである。

【0003】 サンガー法によって処理すれば、その末端

がA（アデニン）、G（グアニン）、T（チミン）、C（シトシン）からなる4種類のDNAフラグメント試料が生成される。処理能力を上げるためには複数のキャピラリーで同時に電気泳動させる必要があるが、その場合、末端塩基別の試料を異なるキャピラリーで泳動させると、キャピラリー間の泳動速度の差が塩基配列決定の誤差となる。そのため、各キャピラリーには4種類の末端塩基のDNAフラグメントを含んだ試料を注入し、複数のキャピラリーで同時に泳動させなければならない。その際、末端塩基の異なる4種類のDNAフラグメントを識別するために、2種類以上の蛍光物質で標識することが行なわれている。

【0004】 末端塩基の異なるDNAフラグメントを識別するための標識物質としては、FAM、JOE、TAMRA及びROXの4種類の発蛍光団を標識として用いる方法（Anal. Chem. 1994, 66, 1021-1026（以下、引用例1という）参照）や、FAMとJOEの2種類を比率を異ならせ結合させることによりコード化して4種類のDNAフラグメントを識別する方法（Anal. Chem. 1992, 64, 2149-2154（以下、引用例2という）参照）が提案されている。いずれにしても、マルチキャピラリーDNAシーケンサの処理能力を上げるためには、多色蛍光標識によって識別できるようにした末端塩基の異なる4種類のDNAフラグメントを含む試料を各キャピラリーに注入し、複数のキャピラリーで複数の試料を同時に泳動させることが背景となっている。

【0005】 複数のキャピラリーで同時に泳動させ、試料から発生する蛍光を検出する光学系の一例は、キャピラリーの配列の側面側から励起光ビームを入射し、キャピラリー配列の垂直方向から蛍光を検出するものである（引用例1参照）。そこでは、キャピラリー表面での散乱に基づくバックグラウンド信号を除去するために、励起光を入射する位置では泳動されてきた試料はキャピラリーを出てシースフローとなるようにしているが、いずれにしてもキャピラリー配列の側面側から複数のシースフローに対し同時に励起光を入射している。

【0006】 他の例では、励起光が1本のキャピラリーを照射するように励起光学系で集光し、キャピラリー中の試料からの蛍光を受光光学系で検出する。励起光学系と受光光学系はともに固定しておいて、キャピラリーが励起光を横切るようにキャピラリーの配列を走査することによって、複数のキャピラリー中の試料からの蛍光を順次検出する（引用例2参照）。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】 引用例1の方法では、シースフローを形成しているため、ビーム強度の減衰は少ないが、シースフロー状態にするためのキャピラリーのセッティングが難しく、マルチ化しにくい問題がある。引用例2の方法では、キャピラリーアレイを機械的に動かして走査するため、キャピラリーがよじれ、マル

チ化の本数に制約を受けやすい。

【0008】その結果、これらの提案された方法では、同時に泳動を行なうキャピラリーの本数に限界があり、1度に分析できる試料の数に制約を受け、処理能力の点でなお改良の余地がある。本発明は高感度で、高速処理に適したマルチキャピラリーDNAシーケンサにおいて、さらに処理能力を高めることを目的とするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明のマルチキャピラリーDNA塩基配列決定装置は、ゲルが充填された複数のキャピラリーが配列され、2種類以上の蛍光物質により識別可能に標識された4種類の末端塩基の異なるDNAフラグメントを含む複数の試料が1つずつキャピラリーに注入されて、全てのキャピラリーで同時に電気泳動されるマルチキャピラリーアレイ泳動部と、マルチキャピラリーアレイ泳動部のキャピラリーアレイの面に対する垂直方向から、泳動方向と直交する1直線に沿って、全キャピラリーに励起光ビームを照射する励起光学系と、励起光学系の励起光ビームにより励起された全キャピラリーの試料からの蛍光を受光し、キャピラリーアレイのキャピラリーの配列方向と直交する方向に波長分散させる分光手段、及びその分光手段により分光された各キャピラリーの試料からの蛍光スペクトルを検出する2次元検出器を備えた受光光学系と、受光光学系の2次元検出器の検出信号からキャピラリーの位置と検出したDNAフラグメントの末端塩基の種類とを認識することにより、各キャピラリーにおける試料の塩基配列を決定するデータ処理・制御部とを備えている。

【0010】

【実施例】図1は第1の実施例を表わす。マルチキャピラリーアレイ泳動部1は紙面垂直方向に立てられた複数のキャピラリー1aが1列に配列されたものであり、図には示されていないがキャピラリー1aの配列位置による温度差やキャピラリーの長さ方向における温度分布をなくすために加温調節機構が備えられている。キャピラリー1aには泳動用のゲルが充填されており、各キャピラリー1aには、例えば引用例1のように末端塩基別に異なる蛍光物質FAM、JOE、TAMRA及びROXにより標識された4種類のDNAフラグメント、又は引用例2のように2種類の蛍光物質FAM及びJOEを用いて4種類が識別できるようにコードされた4種類のDNAフラグメントを含むDNA試料がそれぞれ注入され、同時に電気泳動がなされる。キャピラリー1aに充填されるゲルや泳動用の印加電圧は引用例1、2にも記載されていて既知のものであるが、例えば、ゲルとしてはポリアクリルアミドゲルを用い、印加電圧は100～300V/cmとすることができる。

【0011】励起光ビームEを発生するために、光源としてアルゴンイオンレーザ2aとYAGレーザ2bが設

けられており、アルゴンイオンレーザ2aからのレーザ光がダイクロイックミラー11を透過し、YAGレーザ2bからのレーザ光がダイクロイックミラー11で反射して同じ光軸上の励起光ビームEとなるように、アルゴンイオンレーザ2a、YAGレーザ2b及びダイクロイックミラー11が配列されている。励起光ビームEを発生する1つの方法は、アルゴンイオンレーザ2aからは488nmのレーザ光を発振させ、YAGレーザ2bからは532nmのレーザ光を発振させて2種類の波長を含むレーザ光を励起光ビームEとするものである。励起光ビームEを発生する他の方法は、アルゴンイオンレーザ2aのみを用い、その488nmと514.5nmの2種類の波長のレーザ光を同時に発振させて励起光ビームEとするものである。

【0012】ビームエキスパンダー4はビームを広げるものであり、平面ミラー3により反射されて入射する励起光ビームEを広げ、マルチキャピラリーアレイ泳動部1のキャピラリーアレイに導く。ビームエキスパンダー4と泳動部1のキャピラリーアレイとの間にはシリンドリカルレンズ5が配置され、ビームエキスパンダー4で広げられた励起光がシリンドリカルレンズ5によりライン状に収束され、キャピラリーアレイの面に対する垂直方向から泳動方向と直交する一直線に沿ってキャピラリーアレイに照射される。レーザ2a、2b、ダイクロイックミラー11、平面ミラー3、ビームエキスパンダー4及びシリンドリカルレンズ5は励起光学系を構成している。

【0013】泳動部1のキャピラリーアレイに関し、励起光学系の反対側には試料からの蛍光を検出する受光光学系が配置されている。泳動部1のキャピラリーアレイで、励起光により照射されている部分を泳動するDNAフラグメントから発生する全キャピラリーについての蛍光は、励起光とともにマクロレンズ6で集光され、スリット7及び励起光波長を遮光するノッチフィルタ8を経て凹面グレーティング9に同時に入射して結像される。スリット7はバンド幅を狭くするためのものであり、図では水平方向に幅Wをもつように示されているが、実際には紙面垂直方向に幅Wをもつように配置されたものであり、その幅Wは5～10nmである。ノッチフィルタ8は励起光の波長を遮光するように設計されたものであり、それ以外の波長域の光を透過させる。

【0014】凹面グレーティング9で分光された蛍光を受光するために、検出器10として二次元撮像デバイスが配置されている。二次元撮像デバイスはCCDやPDA（フォトダイオードアレイ）であり、検出器10のx方向には泳動部1のキャピラリーアレイのキャピラリーの位置が対応し、それに直交する方向λは波長分散の方向である。マクロレンズ6、スリット7、ノッチフィルタ8、凹面グレーティング9及び検出器10は受光光学系を構成している。受光光学系における凹面グレーティ

ング9に該当する分光光学系としては、ファブリーペロー、ツェルニターナ、放物面光学系など、いずれでもよい。また、分散素子としてプリズムを使用した系も利用することができる。

【0015】12はデータ処理・制御部としてのCPUでI/Oポートを備えている。CPU12として、例えばパーソナルコンピュータ(PC)を使用することができる。CPU12は検出器10の信号を取り込み、各キャビラリーの位置におけるスペクトルから各キャビラリーの励起光照射位置を泳動したDNAフラグメントの種類を認識することにより、各キャビラリーにおける試料の塩基配列を決定する。

【0016】次に、この実施例の動作について説明する。励起光用レーザ2a、又は2aと2bから出た励起光ビームEは平面ミラー3で角度を変え、ビームエキスパンダー4でビームが広げられ、シリンドリカルレンズ5でライン状に集光されて泳動部1のキャビラリーレイに照射される。キャビラリーレイ中を泳動するDNAフラグメントの標識蛍光物質が励起され、発生した蛍光は励起光とともにマクロレンズ6でイメージとして取り込まれる。マクロレンズ6で取り込まれた蛍光及び励起光はスリット7を通して帯状ビームのバンド幅が狭くされ、ノッチフィルタ8で励起光成分が遮光される。ノッチフィルタ8を透過した蛍光は凹面グレーティング9で分光され、検出器10上にキャビラリーレイの分光された蛍光像を結像させる。CPU12では、検出器10上のデータとしてx方向にキャビラリーレイの位置データ、λ方向に各キャビラリー位置での分光信号を得、時間の経過に伴って各キャビラリーでのDNA試料の塩基配列を得る。

【0017】図2は第2の実施例を表わす。図1ではキャビラリーレイの一直線を同時に励起光で照射するためにビームエキスパンダー4とシリンドリカルレンズ5を使用しているが、それに代わるものとして、図2の実施例ではガルバノミラー又はポリゴンミラー21により励起光ビームEを走査し、fθレンズ22によってキャビラリーレイを垂直方向から、泳動方向に直交する\*

\*一直線に沿って照射するようにしたものである。図2の実施例では、ミラー21の可動部が必要になるが、キャビラリー当たりの入射ビーム強度は図1の実施例に比べて大きくすることができる。

【0018】

【発明の効果】本発明ではキャビラリーレイの面に対する垂直方向から、泳動方向と直交する1直線に沿って、全キャビラリーに励起光ビームを照射し、励起光ビームにより励起された全キャビラリーの試料からの蛍光を受光し、キャビラリーレイのキャビラリーの配列方向と直交する方向に波長分散させて2次元検出器により検出することにより、キャビラリーの位置データとDNAフラグメントの末端塩基の種類とを同時に得るようにしたので、受光光学系では可動部が不要になる。その結果、高感度で、高速処理に適し、処理能力を高めることができる。また、キャビラリーレイを機械的に移動させて走査するのに比べると、キャビラリーがよじれたりする問題がなく、またキャビラリーレイの側面から複数のキャビラリーに同時に励起光ビームを入射するのに比べるとビーム強度の減衰を抑えることができ、キャビラリー間での入射ビーム強度のばらつきを抑えることもできる。

【図面の簡単な説明】

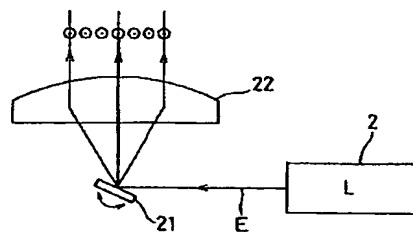
【図1】第1の実施例を示す概略構成図である。

【図2】第2の実施例における励起光学系を示す概略平面図である。

【符号の説明】

- 1 マルチキャビラリーレイ泳動部
- 2 a, 2 b 励起用レーザ
- 4 ビームエキスパンダー
- 5 シリンドリカルレンズ
- 7 スリット
- 8 ノッチフィルタ
- 9 凹面グレーティング
- 10 検出器
- 21 ガルバノミラー
- 22 fθレンズ

【図2】



【図1】

